

## Desarrollo y evaluación de microsatélites derivados de EST para la gestión ecuménica de la merluza europea *Merluccius merluccius*

A. Santafé-Muñoz<sup>1</sup>, M. Pérez<sup>2</sup>, J. Iglesias<sup>2</sup>, F.J. Sánchez<sup>2</sup>, A. Pita<sup>1</sup> y P. Presa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Recursos Genéticos Marinos. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Vigo, 36310 Vigo, angie.santafe@uvigo.es

<sup>2</sup> Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Cabo Estay-Canido, 50. 36390. Vigo

### Summary

The high commercial and organoleptic value of the European hake (*Merluccius merluccius*) together with its overexploitation during the last decades, make this species a promising candidate to marine aquaculture. In this study we have screened 476,747 sequences from a transcriptome library of the European hake. Sixteen microsatellite loci (2 tetranucleotides, 8 trinucleotides, 6 dinucleotides) out of two-hundred ones tested were selected and multiplexed with five previous markers for the systematic genotyping of populations and hatchery hake stocks (IEO-Vigo). Multiplexes testing on 192 wild hakes showed that this EST-derived microsatellite set is analytically and statistically powerful regarding its polymorphism and would allow marker assisted selection of candidate genes in this species.

### Resumen

El gran valor comercial y organoléptico de la merluza europea (*Merluccius merluccius*) junto con su sobreexplotación en las últimas décadas, la convierten en una candidata potencial en acuicultura marina. Partiendo de 476.747 secuencias de una genoteca del transcriptoma de merluza europea, se caracterizaron 200 microsatélites, de los cuales 16 loci (2 tetranucleótidos, 8 trinucleótidos y 6 dinucleótidos), se combinaron en PCR-multiplex junto con cinco marcadores previos para el genotipado sistemático de poblaciones y stocks domésticos de merluza (IEO-Vigo). Su aplicación a 192 merluzas salvajes representativas de su rango natural muestran que este conjunto de microsatélites derivados de EST son una herramienta genética potente, tanto analítica como estadísticamente. Además, la homología de la secuencia de algunos clones con genes expresados en otras especies, puede permitir la selección asistida por marcadores de genes candidatos, además del manejo reproductivo del stock de merluza.

### Justificación

La merluza europea *Merluccius merluccius* es una especie demersal que presenta altas tasas de crecimiento y gran valor comercial (Lloris *et al.*, 2005). Estas propiedades, junto con la sobreexplotación de sus pesquerías la convierten en una candidata potencial para la acuicultura marina (Engelsen *et al.*, 2007). La base genética poblacional de la merluza Atlántica que es origen del stock es bien conocida, sin embargo poco se sabe sobre la carga genética del stock de merluza domesticado en el Instituto Español de Oceanografía de Vigo (Iglesias *et al.*, 2010). Para lograr la gestión eficaz de este stock se requiere la conjugación de criterios genéticos que permitan evitar o minimizar posibles efectos fundadores así como el seguimiento del sistema reproductivo y los cruzamientos dirigidos óptimos para evitar consanguinidad.

### Material y Métodos

La selección de marcadores microsatélites y el diseño de primers se realizaron en QDD2, partiendo de una genoteca del transcriptoma de la merluza europea. Posteriormente con la herramienta web FastPCR se calibraron *in silico* los marcadores elegidos y se agruparon en multiplex, que fueron calibrados y optimizados experimentalmente siguiendo criterios estándar (Buttler, 2005). Estos microsatélites derivados de EST se analizaron en ADN obtenido con el método FENOSALT (Pérez y Presa, 2011) de músculo de 192 individuos pertenecientes a 5 poblaciones del Océano Atlántico y del Mar Mediterráneo. Esta primera aproximación permitió testar su idoneidad como marcadores poblacionales frente a los marcadores neutros utilizados hasta la fecha en esta especie (Morán *et al.*, 1999) y testar su potencia estadística con POWSIM. Su aplicación en muestras del

stock de reproductores del IEO-Vigo e interpretación genotípica con GeneMarker V1.97 (Softgenetics) permitió conocer su estructura reproductiva y su diversidad genética en cultivo.

## Resultados y Discusión

De la genoteca de transcriptoma compuesta por **476.747 EST** se identificaron 17.655 EST que contienen regiones repetidas simples, de las cuales 3.495 eran contigs no redundantes. A partir de estos se seleccionaron 1.483 EST para el diseño de primers, obteniendo como resultado 190 secuencias que cumplieron los criterios más estrictos. Cuarenta y ocho marcadores microsatélite superaron la prueba de ausencia de dímeros, así como la co-amplificación por PCR multiplex *in silico*. Mediante calibración experimental en diez individuos se excluyeron los marcadores que presentaron una aparente falta de polimorfismo o cuya amplificación era subóptima. Se obtuvieron finalmente 16 loci microsatélites derivados de EST (2 tetranucleótidos, 8 trinucleótidos y 6 dinucleótidos), que en combinación con los cinco marcadores polimórficos neutros fueron empleados para la caracterización genotípica de las poblaciones fuente. El escenario poblacional definido con estos microsatélites es básicamente congruente con resultados previos obtenidos con marcadores neutros (Castillo *et al.* 2005). Por otra parte, el elevado polimorfismo (6 y 34 alelos) y heterocigosidad esperada (0,584 a 0,965) permiten la identificación individual, la asignación de puestas en cultivo y la gestión reproductiva asistida del stock cultivado.

## Bibliografía

- Butler, J.M. 2005. Constructing STR multiplex assays. *Methods in Molecular Biology*. 297: 53-66.
- Castillo A.G.F., P. Alvarez y E. Garcia-Vazquez. 2005. Population structure of *Merluccius merluccius* along the Iberian Peninsula coast. *ICES Journal of Marine Science*. 62 (8): 1699-1704.
- Engelsen, R., F. Asche, F. Skjennum y G. Adoff. 2007. New Species in Aquaculture: Some basic economic aspects. En: Culture of cold-water marine fish. E. Moksness, E. Kjørsvik y Y. Olsen (Eds): 487-515.
- Iglesias, J., M.J. Lago, F.J. Sánchez y R. Cal. 2010. Capture, transport and acclimatization to captivity of European hake, *Merluccius merluccius* L.: preliminary data on feeding and growth. *Aquaculture Research*. 41(4): 607-609.
- Lloris, D., J. Matallanas y P. Oliver. 2005. Hakes of the world (Family Merlucciidae). An annotated and illustrated catalogue of hake species known to date. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 2. Rome. FAO. 57 pp.
- Morán, P., C. Lundy, C. Rico y G.M. Hewitt. 1999. Isolation and characterization of microsatellite loci in European hake, *Merluccius merluccius* (Merlucciidae, Teleostei). *Molecular Ecology*. 8: 1357-1358.
- Pérez, M. y P. Presa. 2011. FENOSALT: un método sintético para la extracción de ADN de peces y moluscos. En: Métodos y Técnicas en investigación marina. García-Estévez, J.M.; Olabarria, C.; Pérez, S.; Rolán-Álvarez, E.; Rosón, G. (Eds): 79-87.